



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0042935
(43) 공개일자 2020년04월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/11 (2013.01)
A61K 48/0025 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7008689

(22) 출원일자(국제) 2018년08월22일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2020년03월25일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/047466

(87) 국제공개번호 WO 2019/040586
국제공개일자 2019년02월28일

(30) 우선권주장
62/550,458 2017년08월25일 미국(US)

(71) 출원인
오비드 테라퓨틱스 인크.
미국 뉴욕 10036, 뉴욕 브로드웨이 1460

(72) 발명자
듀링, 매튜
미국 코네티컷 06883, 웨스턴, 시더 레인 14

(74) 대리인
특허법인(유한) 대야

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 재조합 아데노-관련된 벡터들

(57) 요약

아데노-관련된 바이러스 (AAV) 벡터들 및 그것들의 사용들이 제공된다. 더 특이적으로, AAV 벡터들이 제공되며, 그것은 중추신경계 (CNS) 및 지방 조직과 같은 특정 타겟 조직에 대한 특이적 향성(tropism)을 보이고 이는 타겟 조직들 내로 관심있는 유전자들의 도입을 위하여 세포들을 형질도입하는데 사용될 수 있다. 약학적 조성물들은 또한 AAV 벡터들 및 약학적으로 허용 가능한 첨가제, 희석제 또는 담체를 포함하는 것이 제공될 수 있다.

대표도 - 도1a

FIG. 1A

(52) CPC특허분류

A61K 48/005 (2013.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 7/00 (2013.01)
C12N 2750/14121 (2013.01)
C12N 2750/14122 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 코드하는 핵산 분자:

- (i) 도 1A에 제시된 rAAVRec2 VP1, VP2, 또는 VP3 서열들 중 하나 이상; 및/또는
- (ii) 도 1A에 제시된, rAAVRec3 VP1, VP2, 또는 VP3 서열들 중 하나 이상.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 핵산은 재조합 아데노-관련된 바이러스 (AAV) 벡터를 포함하는 핵산.

청구항 3

제 1항에 있어서,

재조합 포유류 세포 내에서 발현되고, 이때 상기 세포는 하기를 발현시키는 핵산 분자;

- (i) 도 1A에 제시된 rAAVRec2 VP1, VP2, 또는 VP3 서열들 중 하나 이상; 및/또는
- (ii) 도 1A에 제시된 rAAVRec3 VP1, VP2, 또는 VP3 서열들 중 하나 이상.

청구항 4

하기를 포함하는 재조합 rAAVRec 캡시드;

- (ii) 도 1A에 제시된 rAAVRec2 VP1, VP2, 또는 VP3 서열들 중 하나 이상; 및/또는
- (iii) 도 1A에 제시된 rAAVRec3 VP1, VP2, 또는 VP3 서열들 중 하나 이상.

청구항 5

아데노-관련된 바이러스 (AAV) 벡터를 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물의 세포 또는 포유동물 내로 이종유래 폴리뉴클레오타이드 서열을 전달(deliver)하는 방법으로, 상기 벡터는 하기를 포함하는 방법:

- (i) 도 1A에 제시된 rAAVRec2 VP1, VP2, 또는 VP3 서열들 중 하나 이상; 및/또는
- (ii) 도 1A에 제시된 rAAVRec3 VP1, VP2, 또는 VP3 서열들 중 하나 이상; 및
- (iii) 상기 포유동물의 세포 또는 상기 포유동물에, 이종유래 폴리뉴클레오타이드 서열, 이로써 포유동물의 세포 또는 포유동물 내로 이종유래 폴리뉴클레오타이드 서열이 전달(deliver) 된다.

청구항 6

제 5항에 있어서,

포유류 세포는 뉴런 세포인 방법.

청구항 7

제 5항에 있어서,

포유류 세포는 지방세포인 방법.

청구항 8

제 5항에 있어서,

이종유래 폴리뉴클레오타이드 서열은 야생형 TSC1, 야생형 TSC2 또는 야생형 SMA 유전자인 방법.

청구항 9

제 5항에 있어서,

포유동물은 단백질 발현 또는 기능에 결함이 있고 치료를 필요로 하는 방법.

청구항 10

제 2항에 있어서,

약학적으로 허용가능한 첨가제, 희석제 및/또는 담체를 더 포함하는 핵산.

청구항 11

제 2항의 핵산을 포함하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 공개는 일반적으로 아데노-관련된 바이러스 (AAV) 벡터들 및 그것의 사용들에 대한 것이다. 더 특이적으로, 본 공개는 중추신경계 (CNS) 및 지방 조직과 같은 특정 타겟 조직에 대한 특이적 향성(tropism)을 보이고, 타겟 조직들 내로 관심있는 유전자들의 도입을 위하여 세포들을 형질도입시키는데 사용될 수 있는 벡터들에 대한 것이다.

배경 기술

[0002]

아데노-관련된 바이러스 (AAV) 는 유전자 치료 적용들을 위하여 현재 이용되고 있는 단일-가닥 DNA 바이러스이다. AAV 는 파보비리대(Parvoviridae) 과, 데펜도바이러스(Dependovirus) 속의 일원이다. 거의 4.7 kb 길이인 (1, 2) AAV 계놈은 반전된 말단 반복(inverted terminal repeat) 요소들 (ITR) (3) 측면에 위치한, 두 개의 오픈 리딩 프레임들(open reading frames) (ORF), rep 및 cap을 포함한다. 다른 세포 타겟들 및 항원 특성들을 가진 AAV의 11 개 알려진 혈청형들이 있다 (Wu et al., 2006). 최근, 이들 주된 AAV 혈청형들의 약 100 의 계놈 변종들이 발견되었다 (6).

[0003]

첫 번째 AAV 벡터들이 AAV2에 기초하여 30 년 전에 만들어졌다 (Tratschin et al., 1984; Hermonat et al., 1984). AAV2 (AAV2)에 기초한 벡터들이 가장 많이 연구되었고 낭포성 섬유증(cystic fibrosis), 혈우병(hemophilia) B, 전립선 및 혹색종(melanoma) 암들, 카나반(Canavan) 병, 알츠하이머, 파킨슨, 근육퇴행위축

(muscular dystrophy), 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis), 및 HIV 백신들 (15)을 포함하는 많은 질병들에 대한 임상 실험들에서 현재 사용된다. 이들 벡터들은 근육, 뇌, 망막, 간, 및 폐의 세포들의 넓은 범위에 유전자들을 전달(deliver)하기 위한 동물 모델들에서 보여져 왔다 (5, 16-22). 현재의 AAV 벡터 시스템들과 관련된 문제들은 특정 조직들의 의도하지 않은 형질도입, 및 관심있는 조직의 효율적인 형질도입의 부족을 포함한다. 따라서, CNS 조직과 같은, 관심있는 특정 조직들에 안전하고 효율적인 유전자 전달(delivery)은 그 분야에서 중요한 도전으로 남아 있다.

도면의 간단한 설명

[0004]

본 재조합 벡터들, 단백질들 조성물들 및 방법들의 여러가지 예들이 도면들을 참조하여 여기에서 기재된다 이때:

도 1A는 rAAVRec3, rAAVRec2, AAV2 및 AAV5의 VP 단백질 정렬을 보여준다. rAAVRec 3 및 rAAVRec2 의 아미노산 서열;

도 1B는 rAAVRec3 및 rAAVRec2의 뉴클레오타이드 서열을 보여준다;

도 2A-B. 도 2A는 AAV1, AAV8, AAV9 및 rAAVRec1-4 내로 포장된(packaged) CAG 프로모터에 의하여 이끌어진 (driven) GFP 발현을 보여준다. 마우스들 뇌의 확대 뷰(view)들. 보여지는 것은 절단들 (a) 선조체(striatum)에서 주사 부위에서 GFP 발현 (칼럼 2). 도 2B. 뇌 내 형질도입된 부분(area)의 총 부피.

도 3은 rAAV 벡터들에 의한 뉴런(neuronal) 또는 신경교(glial) 세포의 형질도입을 보여준다. 합쳐진 GFP 형광 (칼럼 1, 녹색). NeuN 또는 GFAP (칼럼 2, 빨강)은 몇몇 GFP-양성 세포들이 또한 NeuN 또는 GFAP에 대하여 염색되었고, 노란색 합쳐진 형광 (칼럼 3)을 야기하였다는 것을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0005]

개요

[0006]

rAAVRec2 및 rAAVRec3 로 나타내어지는, 본 공개에 따른 재조합 AAV 벡터 혈청형들(serotypes)이 제공된다. rAAVRec2 및 rAAVRec3 벡터들은 각각 지방 및 CNS 조직에 증가된 향성(tropism)을 갖는 것으로 발견된다. 야생형 AAV2 및 AAV5 에서 발견된 그것들에 비하여 현재의 AAV 벡터들은 캡시드(capsid) VP1, VP2 및 VP3 영역들에서 아미노산 잔기들의 변형들을 포함한다 (도 1A). 게다가, rAAVRec3 은 높은 바이러스 역가(titre) 레벨들로 번식될(propagate) 수 있다. 이러한 성장 특성들은 유용한 바이러스 스톡들(stocks)의 효율적이고 대가가 덜 큰 발생에 유리하다.

[0007]

예들에서, 새로운 캡시드들을 코드하는 핵산 문자들에 더하여, 새로운 rAAV 캡시드 단백질들이 제공된다. 특정 예에서, 새로운 캡시드 아미노산 서열들은 도 1A의 그것들을 포함한다 (rAAVRec2 및 rAAVRec3). 이 공개의 측면들에서, 본 공개된 바이러스 캡시드들 및 캡시드 단백질들을 코드하는 핵산 문자들이 제공된다. 본 캡시드 단백질들을 코드하는 핵산 문자들은 도 1B의 그것들을 포함한다 (rAAVRec3). 나아가, 본 공개된 rAAVRec2 및 rAAVRec3 핵산들 및/또는 벡터들을 포함하는, (인 비보 또는 인 비트로) 세포들, 및 rAAVRec2 및 rAAVRec3 캡시드 단백질들을 코드하는 핵산 문자들을 포함하는 벡터들이 제공된다. 예컨대, rAAVRec2 및 rAAVRec3 캡시드 단백질들의 향해진 발현을 위하여, 이러한 핵산들, 벡터들, 및 세포들이 사용될 수 있다. 이러한 단백질 발현은 여기에서 기재된 대로 새로운 AAV 벡터들의 생산을 위하여 (예컨대, 헬퍼 구조체들 또는 패키징(packaging) 세포들) 시약들을 개발하는데 사용될 수 있다. 나아가 재조합 바이러스들 (비리온들(virions))이 제공되고, 이때 상기 바이러스들의 캡시드 단백질은 rAAVRec2의 캡시드 단백질 또는 rAAVRec3의 캡시드 단백질이다. 이러한 바이러스들은 타겟 세포 또는 조직 내로 관심있는 이종유래(heterologous) 핵산을 형질도입(transduce)하는데 사용될 수 있다.

[0008]

본 공개의 측면들에서, 포유동물 또는 포유동물의 세포 내로 이종유래 폴리뉴클레오타이드 서열을 전달 (deliver) 또는 전달시키는(transfer) 방법이 제공되며, 이는 상기 포유동물 또는 상기 포유동물의 세포에, 본 공개에 따른 아데노(adeno)-관련된(associated) 바이러스 (AAV) 벡터를 투여하는 단계를 포함하고, 벡터는 이종유래 폴리뉴클레오타이드 서열 및 도 1A에 제시된 rAAVRec2 및 rAAVRec3 VP1, VP2, 또는 VP3 캡시드 단백질들 중 하나 이상을 포함하고, 이로써 포유동물 또는 포유동물의 세포 내로 이종유래 폴리뉴클레오타이드 서열을 전달 또는 이동시킨다. 예들에서, AAV 벡터는 rAAVRec2 이고 포유류 세포 또는 포유동물의 세포는, 예컨대 지방세포(adipocyte) 세포인, 지방 조직의 세포이다. 예들에서, AAV 는 rAAVRec3이고 포유류 세포 또는 포유동물의 세

포는 예컨대 뉴런 세포인, CNS의 세포이다.

[0009] 본 공개의 추가의 측면에서, 단백질 발현 또는 기능에 결함이 있는 포유동물을 치료하는 방법이 제공되고, 이는 하기 단계를 포함한다: rAAVRec3의 캡시드 단백질들 중 하나 이상을 코드하는, 아데노-관련된 바이러스 (rAAV) 벡터를 투여하는 단계로, 이때 벡터는 또한 양으로(in an amount) 결함이 있는 단백질 발현 또는 기능을 수정할 수 있는 폴리펩타이드를 코드하는 이종유래 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하고 이때 폴리펩타이드는 포유동물에서 발현되는, 단계. 예들에서, rAAV는 rAAVRec3 이고 포유류 세포 또는 포유동물의 세포는 예컨대 뉴런 세포인, CNS의 세포이다. CNS의 세포들을 수반하는 유전자 치료를 위하여, 이종유래 폴리뉴클레오타이드 서열은 결정성 경화증(tuberous sclerosis complex)의 치료를 위하여, 예컨대, 야생형 하마르틴(hamartin) (TSC1) 또는 튜베린(tuberin) (TSC2) 단백질을 코드할 수 있다. 또 다른 예에서, 이종유래 폴리뉴클레오타이드 서열은 척수근위축증(spinal muscular atrophy)의 치료를 위하여 야생 SMA (SMA) 단백질을 코드할 수 있다.

[0010] 예들에서, 단백질 발현 또는 기능에 결함이 있는 포유동물을 치료하는 방법이 제공되고, 이는 하기 단계를 포함한다: rAAVRec2의 캡시드를 코드하는 아데노-관련된 바이러스 (AAV) 벡터를 투여하는 단계로, 그 벡터는 이때 폴리펩타이드가 포유동물에서 발현되는 양으로 결함이 있는 단백질 발현 또는 기능을 수정할 수 있는 폴리펩타이드를 코드하는 이종유래 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 단계. 예들에서, rAAV는 rAAVRec2 이고 포유류 세포 또는 포유동물의 세포는, 예컨대 지방세포인, 지방 조직의 세포이다.

[0011] 유전된(inherited) 지방이상증들(lipodystrophies)에서 체지방의 상실은 다수의 유전자들에서 돌연변이들의 결과로서 지방 조직의 발달 및/또는 분화에서 결함들에 의하여 야기될 수 있다. 본 공개의 예들에서, 이종유래 폴리뉴클레오타이드 서열은 리포디스토르피들(lipodystrophies)과 관련된 결함이 있는 유전자들에 대한 야생형 대응되는 것(counterpart)들을 코드할 수 있다. 따라서, 지방 조직의 세포들을 수반하는 유전자 치료를 위하여, 이종유래 폴리뉴클레오타이드 서열은 예컨대, 야생형 PPARG, AGPAT2, AKT2, BSCL2, 라민(lamin) A/C, 핵 라미나(lamina) 단백질들 및 ZMPSTE24 유전자들을 코드할 수 있다.

[0012] 본 공개의 추가의 측면에서, 약학적 조성물들은 AAVRec3 및 rAAVRec2 벡터들 및 약학적으로 허용가능한 첨가제(excipient), 희석제 또는 담체를 포함하는 것이 제공된다. 본 공개의 또 다른 측면에서, rAAVRec3 및 rAAVRec2 벡터 조성물들 중 하나 이상을 포함하는 키트들이 하나 이상의 약학적으로-허용가능한 첨가제들, 담체들, 희석제들, 아쥬반트들(adjuvants), 및/또는 다른 요소들, 및 대상에서 장애들의 치료에서 rAAV 벡터들을 사용하기 위한 지침들과 함께 제공되고, 보통 종래의 상업적인 패키징을 위하여 제조된 용기들(containers)을 더 포함할 수 있다.

5. 상세한 설명

5.1 재조합 AAV 혈청형들

[0013] rAAVRec2 및 rAAVRec3로 가리키지는 재조합 AAV 벡터 혈청형들이 제공된다. 예들에서, 본 AAV 혈청형들은 도 1A에서 나타난 하이브리드(hybrid) VP1, VP2 및 VP3 아미노산 서열들 중 하나 이상을 포함한다. 본 rAAV 벡터들은 야생형 AAV2 및 AAV5에 비하여 VP1, VP2 및 VP3 영역들을 코드하는 캡시드에서 아미노산 잔기들의 변형들을 포함한다 (도 1A). 공개된 재조합 혈청형들은 관심있는 여러가지 세포들, 조직들 및 기관들의 형질도입에서의 개선된 효율을 보인다. 특이적으로, rAAVRec2 혈청형은 지방 조직의 세포들의 형질도입(transduction)에서 더 높은 효율을 입증하고 반면 rAAVRec3 혈청형은 중추신경계(central nervous system) (CNS)의 세포들의 형질도입(transduction)에서 높은 효율을 입증한다. 게다가, rAAVRec3 바이러스는 다른 AAV 바이러스들에 비하여 높은 역가들(titres)로 증식될 수 있다 (표 1 참조).

[0014] 여기에서 개시된 rAAV 캡시드 단백질들은 우선적으로 지방 조직 (rAAVRec2) 또는 CNS (rAAVRec3)의 세포들을 형질도입할 수 있다. 예들에서, rAAV 캡시드 단백질들은 도 1에 나타낸 대로 AAVRec3 및 rAAVRec2의 VP1-3 아미노산 서열들을 포함한다. 몇몇 예들에서, 변형된 rAAVRec2 및 rAAVRec3 캡시드 단백질들이 rAAVRec 2 및 rAAVRec3 캡시드 단백질들의 아미노산 서열에 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일(identical)한 아미노산 서열들을 갖는 것이 제공된다(도 1A). 이러한 변형된 캡시드 단백질들은 주로 rAAVRec2 및 rAAVRec3에 대하여 관찰되는 향성(tropism)을 보유한다. 예컨대, 변형된 캡시드 단백질 또는 변형된 캡시드를 포함하는 바이러스 입자는 주로 도 1A의 rAAVRec3 캡시드 또는 캡시드 단백질을 포함하는 rAAVRec3 바이러스 입자의 CNS 향성(tropism) 프로파일을 보유할 수 있다. 나아가, 변형된 캡시드 또는 변형된 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 입자는 주로 도 1A의 rAAVRec2 캡시드 또는 캡시드 단백질을 포함하는 rAAVRec2 바이러스 입자의 지방 조직 향성(tropism) 프로파일을 보유할 수 있다.

- [0017] 도 1의 AAV 캡시드 단백질들 (VP1-3) 중 하나 이상을 코드하는 핵산 분자들이 제공된다. 예들에서, 핵산 분자는 도 1B의 그것을 포함한다. 예들에서, 서열을 코드하는 AAV 캡시드는 도 1B의 뉴클레오타이드 서열에 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일(identical)하고 CNS의 세포들에 대한 향성(tropism)과 AAV 캡시드 단백질들을 코드한다.
- [0018] 그 분야에 알려진 대로 다수의 다른 프로그램들이 핵산 또는 폴리펩타이드이 알려진 서열과 서열 동일성(identity)을 갖는지 여부를 확인하는데 사용될 수 있다. 여기에서 사용된 대로 퍼센트 동일성(identity)은 핵산 또는 그것의 단편이, BLASTN을 이용하여, 다른 핵산 (또는 그것의 상보적 가닥)과 (적절한 뉴클레오타이드 삽입들 또는 결실들)과 최적으로 정렬될 때 또다른 핵산에 특정된 퍼센트 동일성(identity)을 공유한다는 것을 의미한다. 두 개의 다른 핵산들 사이에서 퍼센트 동일성(identity)을 결정하기 위하여, 퍼센트 동일성(identity)은 BLASTN 프로그램 "BLAST 2 서열들(sequences)" 을 이용하여 결정되는 것이다. 이 프로그램은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)으로부터 공공 사용을 위하여 이용가능하다. 폴리펩타이드들을 가리킬 때 퍼센트 동일성(identity) 또는 유사성(similarity)은, BLASTP을 이용하여 결정된 대로 공통 길이들에 걸쳐 또다른 단백질 또는 그것의 부분에 비교할 때, 논의가 되는 폴리펩타이드가 특정 퍼센트 동일성(identity) 또는 유사성(similarity)를 보인다는 것을 가리킨다. 이 프로그램은 또한 National Center for Biotechnology Information (NCBI)으로부터 공공 이용을 위하여 이용가능하다.
- [0019] 본 개시된 AAV 캡시드 단백질들은 단편, 변형된 형태 또는 변종이 전장 단백질의 기능 및 조직 향성(tropism)을 보유하는 한, 기능적 단백질 단편들, 변형된 형태들 또는 서열 변종들(variants)을 비롯하여 전장(full-length) rAAVRec2 및 rAAVRec3 VP-1, VP-2 및 VP-3 서열들을 포함한다. 게다가, 도 1A의 AAV 캡시드 단백질들은 원하는 물성들을 주기 위하여 그 분야에서 알려진 변형들을 통합하기 위하여 더 변형될 수 있다. 예들에서, 캡시드 단백질(들)은 정제 및/또는 겹출을 용이하게 하기 위하여 서열들 ("태그들(tags)")을 통합하기 위하여 변형될 수 있다. 이러한 태그들은 예컨대, 폴리히스티딘(polyhistidine) (HIS) 또는 글루타티온(glutathione) S-트랜스페라제(transferase) (GST), Glu-Glu, 및 스트렙타비딘(streptavidin) 결합(binding) 단백질 태그들을 포함한다. 이러한 변형들을 AAV 캡시드 내에 삽입하는 방법들은 그 분야에 알려져 있다.
- [0020] 본 공개는 나아가 rAAVRec2 및 rAAVRec3 캡시드 단백질들을 코드하는 핵산 분자들을 포함하는 발현 벡터들에 대한 것이다. rAAVRec2 및 rAAVRec3 캡시드 단백질들을 코드하는 핵산 분자들은, 분리되고 정제될 수 있는 발현 벡터의 부분으로서 사용될 수 있다. 이러한 발현 벡터들은 rAAV 스톡들의 발생을 위하여 헬퍼 벡터들로서의 사용을 위하여 분리 및 정제될 수 있다. 이러한 바이러스 스톡들은 관심있는 이종유래 핵산을 갖는 벡터 계보를 포함할 수 있다. 서열들은 또한 rAAVRec2 및 rAAVRec3 캡시드 단백질들의 생산을 위하여 세포들을 형질도입하는데 사용될 수 있다. rAAVRec2 및 rAAVRec3 캡시드 단백질들을 코드하는 핵산 분자들은 그것들의 발현을 위하여 하기 기재된 방법들 중 임의의 것을 이용하여 발현 벡터 내로 함께 또는 따로따로 삽입될 수 있다. 서열들은 또한 부분적인 VP1-VP2-VP3 또는 VP1-VP3 또는 VP1-VP1-VP2-VP3와 같이 길이가 줄여질(truncate) 수 있다.
- [0021] 예들에서, rAAVRec2 및 rAAVRec3 단백질들의 발현을 위한 벡터들은 플라스미드, 과지, 바이러스 벡터 (예컨대, AAV 벡터, 아데노바이러스 벡터, 헤르페스바이러스 벡터 또는 배콜로바이러스(baculovirus) 벡터), 포유류 벡터, 박테리아(bacterial) 인공(artificial) 염색체(chromosome) (BAC), 또는 효모(yeast) 인공(artificial) 염색체(chromosome) (YAC)를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 벡터는 5' 및/또는 3' 말단 반복 (예컨대, 5' 및/또는 3' AAV 말단 반복)을 포함하는 AAV 벡터를 포함할 수 있다. 본 개시된 벡터들은 전사/번역 통제 신호들, 복제 기점들, 폴리아데닐화 신호들, 내부 리보솜 출입 부위들(internal ribosome entry sites) (IRES), 프로모터들, 인핸서들, 등과 같은 발현 통제 요소들을 더 포함할 수 있다.
- [0022] 여기에서 기재된 AAV 벡터들은 예컨대, 타겟 조직들 내로 관심있는 유전자들의 도입을 위하여 지방 조직 및 CNS의 세포들인, 특정 종류들의 포유류 세포들을 형질도입하기 위하여 사용될 수 있다. CNS의 세포들은 예컨대, 뉴런들 및 아교(glia) 세포들을 포함한다. 지방 조직의 세포들은 지방세포들을 포함한다. 따라서, 본 공개는 AAV-기반의 발현 시스템들, 및 벡터들을 고려하며 이때 AAV 발현 벡터들은 치료적 웨타이드, 단백질, 폴리펩타이드, 또는 안티센스(antisense) 분자를 코드하는, 적어도 첫 번째 이종유래 핵산 분자를 포함한다.
- [0023] 유전병은 단백질 산물을 생산하는데 실패하거나, 적절하게 기능하는데 실패한 단백질 산물을 생산하거나, 또는 세포의 적절한 기능을 방해하는 제대로 기능하지 않는(dysfunctional) 단백질 산물을 생산하는 결함이 있는 유전자들의 존재와 관련된다. 유전자 전달(transfer)은 이러한 유전병에 대한 치료를 제공하는데 사용될 수 있다. 따라서, 본 공개의 측면들에서, 본 rAAV 벡터들은 제대로 기능하지 않는(dysfunctional) 단백질의 활성 또는 생산을 보이는 폴리뉴클레오타이드 또는 치료적으로 기능적인 단백질을 코드할 수 있는 이종유래 핵산을

포함한다.

- [0024] 뉴런들에 rAAV 발현 벡터들을 타겟으로 하는 능력은 특히 예컨대 CNS의 유전병들을 포함하는 뉴런 기능장애(dysfunction)를 수반하는 질병들 또는 장애들을 치료하는데 유용할 수 있다. 예들에서, 본 rAAVRec3 벡터들은 예컨대, 뉴런 세포들과 같은, 뇌의 세포들 내로 도입을 위한 이종유래 핵산을 포함한다. 예들에서, 벡터들은 예컨대, 뉴런들의 성장 및/또는 분화를 촉진하기 위하여, 뉴런들에 유리한 효과를 제공하는 핵산 또는 폴리펩타이드를 발현시키는데 유용하다.
- [0025] 예들에서, 본 rAAV 벡터들은 결정성 경화증(tuberous sclerosis complex) (TSC) 환자들을 치료하기 위하여 조작될 수 있다. 결정성 경화증(Tuberous sclerosis complex)는 뇌에 영향을 미쳐, 발작들, 과다활동 및 공격성과 같은 행동 문제들 및 지적 장애 또는 학습 문제들을 야기할 수 있는 유전 장애이다. 일부 TSC 고통받는 어린이들은 자폐증의 특징들을 갖는다. 게다가, 양성 뇌 종양들은 또한 TSC를 가진 사람들에게서 발달할 수 있다.
- [0026] TSC는 각각 하마르틴(hamartin) 및 투베린(tuberin) 단백질들을 코드하는, TSC1 또는 TSC2 유전자들에서 돌연변이들에 의하여 야기되는 상염색체 우성인 유전병이다. 따라서, 본 기재된 rAAVRec3 벡터들은 TSC 환자들의 뉴런 세포들 내로 야생형 하마르틴(hamartin) 또는 투베린(tuberin) 유전자들을 형질도입하기 위하여 유전자 치료 적용들에 조작되어 사용될 수 있다. 예들에서, AAV 벡터는 야생형 하마르틴(hamartin) 단백질을 코드하는 이종유래 핵산을 포함하는 것이 제공된다. 다른 예들에서, AAV 벡터는 야생형 투베린(tuberin) 단백질을 코드하는 이종유래 핵산을 포함하는 것이 제공된다. (Kwiatkowski et al., 2010. Tuberous Sclerosis Complex: Genes, Clinical Features and Therapeutics. Wiley-Blackwell, Weinheim, Germany 참조).
- [0027] 예들에서, 본 기재된 rAAVRec3 벡터들은 척수근위축증(spinal muscular atrophy) (SMA) 타입(Type) 1을 치료하는데 사용될 수 있다. SMA는 자발적인 근육 운동을 통제하는 신경계의 부분에 영향을 미치는 유전병이다. SMA는 척수에서 운동(motor) 뉴런들로 불리는 신경 세포들의 상실을 수반한다. 유전적 장애는 SMN1로 불리는 운동 뉴런 단백질의 결함에 의하여 야기된다. 따라서, 본 개시된 rAAVRec3 벡터들은 SMN 환자들의 뉴런 세포들 내로 야생형 SMN1 유전자를 형질도입하기 위하여 유전자 치료 적용들에서 조작되고 사용될 수 있다. 예들에서, rAAVRec3 벡터는 야생형 SMN1 단백질을 코드하는 이종유래 핵산을 포함하는 것이 제공된다. (Lefebvre S, et al. Cell. 1995;80:155-165: Wetz and Sahin Ann NY Acad Sci 2016 1366(1):5-19 참조).
- [0028] 지방 조직으로 AAV 발현 벡터들을 타겟팅하는 능력은 또한 예컨대, 지방이상증들과 같은 유전병들을 포함하는 지방세포 기능장애를 포함하는 질병들 또는 장애들을 치료하는데 유용할 수 있다. 유전된 지방이상증들은 다수의 유전자들에서 돌연변이들의 결과로서 지방 조직의 발달 및/또는 분화에서 결함들에 의하여 야기될 수 있다. 이러한 유전자들은 결함이 있는 PPARG, AGPAT2, AKT2, BSCL2, 라민(lamin) A/C, 핵 라미나(lamina) 단백질들 및 ZMPSTE24 유전자들을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예들에서, 본 기재된 rAAV 벡터들은 예컨대, 지방세포들과 같은, 지방질(adipose)의 세포들 내로 도입(introduction)을 위한 이종유래 핵산을 포함한다. 예들에서, 벡터들은 예컨대, 지방세포들의 성장 및/또는 분화를 촉진하기 위하여, 지방세포들에 이로운 효과를 제공하는 핵산 또는 폴리펩타이드를 발현시키는데 유용하다. 한 예에서, 이종유래 폴리뉴클레오타이드 서열은 리포디스토르피들(lipodystrophies)과 관련된 결함이 있는 유전자들에 대한 야생형 대응되는 것(counterpart)을 코드할 수 있다. 따라서, 지방 조직의 세포들을 수반하는 유전자 치료를 위하여, 이종유래 폴리뉴클레오타이드 서열은 예컨대, 야생형 PPARG, AGPAT2, AKT2, BSCL2, 라민(lamin) A/C, 핵 라미나(lamina) 단백질들 및 ZMPSTE24 유전자들을 코드할 수 있다.
- [0029] 당업자는 관심있는 이종유래 핵산(들)이 적절한 대조군 서열들과 사용가능하게(operably) 관련될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예컨대, 이종유래 핵산들은 전사/번역 통제 신호들, 복제 기점들, 폴리아데닐화 신호들, 내부 리보솜 출입 부위들(internal ribosome entry sites) (IRES), 프로모터들, 인핸서들 등과 같은 발현 통제 요소들과 사용가능하게 관련될 수 있다. 이러한 요소들은 또한 선택적으로 전사 종결 신호를 포함할 수 있다. 전사 종결 신호의 특정 제한되지 않는 예는 SV40 전사 종결 신호이다. 게다가, 이종유래 핵산 분자는 새로운 AAV 캡시드를 내로 분자의 단백질막 둘러싸기(encapsulation)를 위하여 AAV 5' 및/또는 3' 말단 반복들(terminal repeats) (예컨대, 5' 및/또는 3' AAV 말단 반복)을 포함할 수 있다. 예들에서 이때 이종유래 핵산은 전사되고(transcribe) 그 다음에 타겟 세포들에서 번역되고, 특이적 개시 신호들이 일반적을오 삽입된 단백질 코딩 서열들의 효과적인 번역을 위하여 이용된다. ATG 개시 코돈 및 인접한 서열들을 포함할 수 있는, 이를 외인성(exogenous) 번역 통제 서열들은 자연적 및 합성적 둘 다, 여러가지 기원들의 것일 수 있다.
- [0030] 여러가지 프로모터/인핸서 요소들이 원하는 조직-특이적 발현 및 레벨에 따라 사용될 수 있다. 프로모터/인핸서는 원하는 발현 패턴에 따라 항시 발현되거나(constitutive) 또는 유도가능할(inducible) 수 있다. 프로모터/인

핸서 요소는 일반적으로 관심있는 타겟 세포(들)에서 기능하도록 선택된다. 대표적인 예들에서, 프로모터/인핸서 요소는 포유류 프로모터/인핸서 요소이다. 특정 예에서 프로모터/인핸서는 지방 조직의 세포들 또는 CNS의 세포들에서 특이적으로 기능하는 요소이다. 프로모터/인핸스 요소는 또한 항상 발현되거나(constitutive) 또는 유도가능할(inducible) 수 있다.

[0031] 본 발명은 rAAVRec2 및 rAAVRec3 바이러스 입자들 (즉, (비리온들(virions))을 제공하고 이때 바이러스 입자는 벡터 게놈, 선택적으로 관심있는 이종유래 핵산을 포함하는 AAV 벡터 게놈을 포장한다. 이러한 바이러스 입자들은 지방 조직 (rAAVRec2) 또는 CNS 조직 (rAAVRec3)에 대하여 향성(tropism)을 보인다. 바이러스 입자들의 증식을 위한 방법들은 당업자들에게 잘 알려져 있다 (예컨대, Shin et al., Methods Mol. Biol. 798:267-284 참조). AAV는 용해성(lytic) 바이러스로서 그리고 프로바이러스(provirus)로서 둘 다 증식될 수 있다. 용해성 성장을 위하여, AAV는, 예컨대, 아데노바이러스 또는 단순 헤르페서(herpes simplex) 바이러스들과 같은 헬퍼 바이러스와 공동(co)-감염을 요구한다. 헬퍼(helper) 바이러스의 부존재 시, AAV는 통합된 (integrated) 프로바이러스로서 존재할 것이다. AAV 프로바이러스를 나르는 세포들이 그 뒤에 헬퍼로 감염될 때, 통합된 AAV 게놈이 구조되고(rescued) 생산적인(productive) 용해성(lytic) 사이클이 발생한다. 대체하여, 헬퍼 바이러스 기능들은 안정적인 염색체 외(extrachromosomal) 요소로서 유지되거나 또는 염색체에 통합된 헬퍼 유전자들과 패키징 세포에 의하여 제공될 수 있다.

[0032] 바이러스 입자들의 증식을 위하여, 세포는 보통 AAV 바이러스 복제에 대하여 관대한(permissive) 세포이다. 포유류 세포들과 같이, 이 분야에 알려진 임의의 적합한 세포가 사용될 수 있다. 또한 적합한 것은, 예컨대, 293 세포들 또는 다른 E1A 트랜스(trans)-상호보완하는(complementing) 세포들인, 복제-결함이 있는 헬퍼 바이러스로부터 결실된 기능들을 제공하는 트랜스(trans)-상호보완하는(complementing) 패키징 세포주들이다.

[0033] 예들에서, 재조합 바이러스 입자들을 생산하는 방법들은 인 비트로에서 세포에, (a) (i) 이종유래 핵산, 및 (ii) (AAV 말단 반복들과 같은) 바이러스 입자들 내로 벡터 게놈의 단백질막 둘러싸기(encapsidation)에 충분한 패키징 신호 서열들을 포함하는 벡터 게놈, 및 (b) 바이러스 입자들 내로 벡터 게놈의 복제 및 단백질막 둘러싸기(encapsidation)에 충분한 AAV rep 및 AAV cap 서열들을 제공하는 단계를 포함한다. 벡터 게놈 핵산 및 AAV rep 및 cap 서열들은 벡터 게놈을 포함하는 재조합 바이러스 입자들이 세포에서 생산되는 캡시드 내에 포장되는 조건들 하 제공된다.

[0034] 몇몇 예들에서, 바이러스 입자들은 오염을 감소시키고 약효를 증가시키기 위하여, 예컨대, 인 비보(in vivo) 투여를 위한 것과 같이 분리 및 정제된다. 본 포장(packaging) 방법들은 바이러스 입자들의 높은 역가(titer) 스톡들(stocks)을 생산하기 위하여 이용될 수 있다. 예들에서, 바이러스 스톡(stock)은 적어도 약 약 10^5 형질도 입(transducing) 단위들(units) (tu)/ml, 적어도 약 10^6 tu/ml, 적어도 약 10^7 tu/ml, 적어도 약 10^8 tu/ml, 적어도 약 10^9 tu/ml, 또는 적어도 약 10^{10} tu/ml의 역가를 가질 수 있다.

5.2. 재조합 바이러스 벡터의 사용들

[0035] 본 공개는 CNS 및 지방 조직과 같은 특정 타겟 조직에 대하여 특이적 향성(tropism)을 보이는 바이러스들 (비리온들) 및 rAAVRec2 및 rAAVRec3 벡터들을 제공한다. 예들에서, rAAV 벡터들 및 비리온들은 예컨대, 지방 조직의 세포들 및 CNS의 포유류 세포들을 포함하는 포유류 숙주 세포들의 형질도입에 사용된다. rAAVRec2 및 rAAVRec3 벡터들 또는 바이러스들은 세포들 및 그것의 자손 내로 안정적으로 또는 일시적으로 이종유래 핵산들을 전달(deliver) 또는 도입하는데 사용될 수 있다. 이종유래(Heterologous) 핵산들은 억제성 폴리뉴클레오타이드로 전사되는 폴리뉴클레오타이드 또는 단백질 또는 폴리펩타이드를 코드하는 유전자와 같은, 임의의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0036] 여기에서 개시된 rAAVRec2 및 rAAVRec3 벡터들은 예컨대, 대상에서 인 비보로 핵산 또는 치료적 폴리펩타이드를 발현시키기 위하여, 그것을 필요로 하는 대상에게 뉴클레오타이드 서열을 전달하는(delivering) 방법들에 유용하다. 대상은 폴리펩타이드 또는 핵산을 필요로 할 수 있는데 이는 대상이 폴리펩타이드의 결함을 갖기 때문이다, 또는 대상에서 핵산 또는 폴리펩타이드의 생산이 일부 치료적 효과를 줄 수 있기 때문이다.

[0037] 여기에서 포유동물의 세포 또는 포유동물 내로 이종유래 폴리뉴클레오타이드 서열을 전달(deliver)하는 방법들이 개시된다. 예들에서, 그 방법은 포유동물의 세포 또는 포유동물 내로 이종유래 폴리뉴클레오타이드 서열을 전달(deliver)하기에 적합한 조건들 하 포유동물의 세포 또는 포유동물에 이종유래 핵산을 포함하는 rAAV 벡터를 투여하여, 이종유래 폴리뉴클레오타이드를 전달(deliver)하는 단계를 포함한다. 한 측면에서, 그 방법은 포

유동물 및/또는 세포 내로 이종유래 핵산의 전달(delivery)을 가능하게 한다. 또다른 측면에서, 그 방법은 포유동물 및/또는 세포 내로 이종유래 폴리뉴클레오타이드의 전달(delivery), 및 그 다음의 이종유래 폴리뉴클레오타이드의 전사를 가능하게 하여, 전사체(transcript)를 형성한다. 추가의 측면에서, 그 발명은 세포 내로 이종유래 폴리뉴클레오타이드의 전달(delivery), 및 그 다음의 전사체를 형성하기 위한 전사 및 그 다음의 유전자 산물(단백질)을 형성하기 위한 번역을 가능하게 한다.

[0039] 한 측면에서, 지방 조직의 세포들에 관심있는 핵산을 전달(deliver)하는 방법이 제공되고, 그 방법은 여기에 개시된 rAAVRec2 입자로 지방 조직의 세포들을 접촉하는 단계를 포함한다. 또다른 측면에서, 방법은 포유류 대상에서 지방 조직에 관심있는 핵산을 전달(deliver)하는 것이 제공되고, 그 방법은 포유류 대상에 본 공개에 따른 약학적 제제 또는 rAAVRec2 바이러스 입자의 효과적인 양을 투여하는 단계를 포함한다.

[0040] 또다른 측면에서, CNS의 세포에 관심있는 핵산을 전달(deliver)하는 방법이 제공되고, 그 방법은 본 공개에 따른 rAAVRec3 입자와 뉴런을 접촉하는 단계를 포함한다. 또다른 측면에서, 포유류 대상에서 뇌 조직에 관심있는 핵산을 전달(deliver)하는 방법이 제공되고, 그 방법은 포유류 대상에 약학적 제제 또는 rAAVRec3 바이러스 입자의 효과적인 양을 투여하는 단계를 포함한다.

[0041] 한 예에서, 그 방법은 포유류 대상에 본 rAAV 벡터의 양을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 벡터는 단백질을 코드하는 이종유래 핵산을 포함하고 이때 이종유래 핵산은 상기 핵산의 전사를 부여하는 발현 통제 요소에 사용 가능하게(operably) 연결되고, 상기 단백질은 포유동물에서 발현된다. 특정 측면들에서, 단백질의 발현은 포유동물에 치료적 이점을 제공한다.

[0042] 중추신경계 조직에 대한 rAAVRec3 벡터의 향성(tropism)은 뇌 장애들의 치료에 이용될 수 있다. rAAVRec3 벡터는 인 비트로에서 또는 엑스 비보(ex vivo) 유전자 치료를 위하여 핵산 또는 폴리펩타이드를 생산하기 위하여 CNS의 세포들에 관심있는 뉴클레오타이드 서열을 전달(deliver)하기 위하여 이용될 수 있다. 한 예에서, 벡터들은 예컨대, 뉴런들의 성장 및/또는 분화를 촉진하기 위하여, CNS의 세포들에 이로운 효과를 제공하는 핵산 또는 폴리펩타이드를 발현시키는데 유용하다. 뉴런들에 벡터들을 타겟팅하는 능력은 뉴런들 기능장애를 수반하는 질병들 또는 장애들을 치료하는데 유용할 수 있다.

[0043] 한 예에서, 대상에서 신경학적 질병 또는 장애를 치료하는 방법은 CNS의 세포들을 선택적으로 형질도입할 수 있는 rAAVRec3 벡터를 투여하는 단계를 포함한다. 뇌, 척수, 신경절(ganglia), 운동 신경, 감각 신경(sensory nerve), 자율 신경(autonomic nerve), 시각 신경(optic nerve), 망막 신경(retinal nerve), 및 청각 신경(auditory nerve)의 질병 또는 장애와 같은 당업자에게 잘 알려진 많은 신경학적 질병들 또는 장애들이 있다. 뇌 질병들 또는 장애들은 암 또는 다른 뇌 종양, 염증, 박테리아 감염들, 광경병, 아메바 또는 기생충 감염들을 포함하는, 바이러스 감염들, 뇌졸중, 마비, 알츠하이머 질병, 파킨슨 질병 또는 다른 치매(dementia) 또는 인지 기능의 감소와 같은, 신경변성 장애들, 플라크들(plaques), 뇌병증(encephalopathy), 헌팅턴 병, 동맥류, 유전적 또는 후천적 기형들, 후천적 뇌 손상, 뚜렛(Tourette) 증후군, 기면증, 근육퇴행위축(muscular dystrophy), 떨림들(tremors), 뇌성마비, 자폐, 다운 증후군, 주의력 결핍(attention deficit), 주의력 결핍 과다 활동 장애(attention deficit hyperactivity disorder), 만성 염증, 간질, 혼수(coma), 수막염, 다발 경화증, 종증근무력증(myasthenia gravis), 여러가지 신경병증들(neuropathies), 하지불안증후군(restless leg syndrome) 및 테이-삭스(Tay-Sachs) 질병을 포함할 수 있다.

[0044] 한 측면에서, 여기에서 개시된 조성물들은 결정성 경화증(tuberous sclerosis complex) (TSC) 환자들을 치료하는데 사용될 수 있다. TSC는 각각 하마르틴(hamartin) 및 튜베린(tuberin)을 코드하는 TSC1 또는 TSC2 유전자들에서 돌연변이들에 의하여 야기되는 상염색체 우성인 유전병이다. 여기에서 개시된 rAAV 벡터들은 TSC 환자들로 세포들 내로 야생형 하마르틴(hamartin) 또는 튜베린(tuberin) 유전자를 형질도입하기 위하여 유전자 치료 적용들에서 사용될 수 있다.

[0045] 또다른 측면에서, 여기에서 개시된 rAVV 벡터들은 환자에게 SMA 이식유전자(transgene)을 발현시키기 위하여 조작된 rAAVRec3 바이러스를 투여함으로써 척수근위축증(spinal muscular atrophy) (SMA) 타입(Type) 1을 치료하는데 사용될 수 있다. SMA는 자발적인 근육 운동을 통제하는 신경계의 부분에 영향을 미치는 유전병이다. SMA는 척수에서 운동 뉴런들로 불리는 신경 세포들의 상실을 수반하고 운동 뉴런 질병으로 분류된다. 유전적 장애는 SMN으로 불리는 운동 뉴런 단백질의 결함에 의하여 야기된다.

[0046] 지방 조직에 대한 rAAVRec2 벡터의 향성(tropism)은 지방 조직 장애들의 치료를 위하여 이용될 수 있다. rAAVRec2 벡터는 엑스 비보 유전자 치료 또는 인 비트로에서 핵산 또는 폴리펩타이드를 생산하기 위하여 지방

조직의 세포들에 관심있는 뉴클레오파이드 서열을 전달(deliver)하기 위하여 이용될 수 있다. 벡터들은 예컨대, 지방세포들의 성장 및/또는 분화를 촉진하기 위하여 지방 조직의 세포들에 이로운 영향을 제공하는 핵산 또는 폴리펩타이드를 발현시키는데 유용하다. 지방세포들을 벡터들을 타겟팅하는 능력은 지방세포 기능장애를 포함하는 질병들 또는 장애들을 치료하는데 유용할 수 있다. 예컨대, 유전된 지방이상증들은 예컨대, PPARG, AGPAT2, AKT2, BSCL2, 라민(lamin) A/C, 핵 라미나(lamina) 단백질들 및 ZMPSTE24 유전자들을 포함하는, 다수의 유전자들에서의 돌연변이들의 결과로 지방 조직의 발달 및/또는 분화에서의 결함들에 의하여 야기될 수 있다. 예들에서, 이종유래 폴리뉴클레오파이드 서열은 지방이상증들과 관련된 결함이 있는 유전자들의 야생형 대응되는 것들(counterparts)을 코드할 것이다.

[0047] 한 예에서, rAAVRec2 또는 rAAVRec3 벡터들을 포함하는 약학적 조성물들이 제공된다. 본 약학적 조성물들은 약학적으로 허용가능한 첨가제, 희석제 또는 담체를 포함할 수 있다. "약학적으로 허용가능한 담체"는 조성물의 유효 성분과 조합될 때, 성분들이 의도되지 않은 면역 반응과 같은, 지장을 주는 생리학적 반응들을 야기하는 것 없이 생물학적 활성을 보유하는 것을 가능하게 하는, 임의의 물질을 포함한다. 약학적으로 허용가능한 담체들은 물, 인산 완충 식염수(phosphate buffered saline), 오일/물 에멀젼과 같은 에멀젼들, 및 습윤제들(wetting agent)을 포함한다. 이러한 담체들을 포함하는 조성물들은 Remington's Pharmaceutical Sciences, current Ed., Mack Publishing Co., Easton Pa. 18042, USA; A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Ansel et al., 7th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; and Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe et al., 3rd ed. Amer. Pharmaceutical Assoc에 쓰인 것들과 같이 잘 알려진 종래의 방법들에 의하여 제형화된다.

[0048] 이러한 조성물들은 종래의 방법들에 의하여 제형화될 수 있고 적절한 복용량(dose)에서 대상에 투여될 수 있다. 투여량(dosage) 식이요법(regimen)은 담당 의사 및 다른 임상적 요인들에 의하여 결정될 것이다. 의약 분야에서 잘 알려져 있듯이, 임의의 하나의 환자를 위한 투여량(dosages)은 환자의 크기, 신체 표면적, 연령, 성별, 투여되는 특정 화합물, 투여의 시간 및 루트, 감염 또는 질병의 종류 및 단계, 일반 건강(general health) 및 동시에 투여되는 다른 의약들을 포함하는 많은 요인들에 의존한다. 당업자는 다른 요인들을 비롯하여 전술한 요인들에 기초한 특정 질병 또는 장애를 갖는 환자를 효과적으로 치료하기 위하여 rAAVRec2 또는 rAAVRec3 벡터 복용량(dose) 범위를 쉽게 결정할 수 있다.

[0049] 치료를 위한 "효과적인" 양은 보통, 질병의 진행 또는 악화를 하락, 감소, 억제, 저해, 제한 또는 통제함에도 불구하고, 측정가능한 정도까지, 하나, 복수 개 또는 모든 부정적인(adverse) 증상들(symptoms), 질병의 결과들 또는 합병증들, 하나 이상의 부정적인 증상들, 장애들, 병들, 병적 측면들(pathologies), 또는 예컨대, 질병에 의하여 야기되거나 또는 이와 관련된, 합병증들에 반응을 제공하는데 효과적이다.

[0050] 치료에 적절한 대상들은 불충분한 양을 생산하는 또는 기능적 유전자 산물(단백질)에서 결함을 갖는 위험에 처하거나 이를 갖는 것들을 포함하거나, 또는 질병으로 이끌 수 있는, 일탈적인(aberrant), 부분적으로 기능적인, 또는 비-기능성인(non-functional) 단백질을 생산한다. 치료에 적절한 대상들은 또한 질병으로 이끄는 일탈적인, 또는 결함이 있는 단백질을 생산하는 위험에 처하거나 이를 갖는 그들을 포함하여, 일탈적인, 또는 결함이 있는 단백질의 양, 발현 또는 기능을 감소시키는 것이 질병의 치료를 이끌거나 또는 하나 이상의 증상을 감소시키거나 또는 질병을 개선(ameliorate)할 것이다. 그러므로 타겟 대상들은 질병 종류, 발병(onset)의 타이밍 또는 정도, 증상들의 진행, 심각도, 빈도 또는 종류 또는 기간에 상관없이 이러한 결함들을 갖는 대상들을 포함한다.

[0051] 투여의 모범적인 모드들은 (예컨대, 간, 골격근, 심근, 횡경막 근 또는 뇌로) 직접적인 조직 또는 기관 주사를 비롯하여, 경구, 직장, 점막경유, 국소로(topical), 비강 내로(intranasal), 흡입(inhalation) (예컨대, 에어로졸을 통하여), 구강(buccal) (예컨대, 혀 밑), 질, 척추강내(intrathecal), 안구내(intraocular), 경피(transdermal), 자궁내(in utero) (또는 난자 내(in ovo)), 비경구로(parenteral) (예컨대, 정맥내(intravenous), 피하(subcutaneous), 피내(intradermal), [골격, 횡경막 및/또는 심근에의 투여를 포함하여] 근육 내(intramuscular), 진피내(intradermal), 흉막내(intrapleural), 뇌내(intracerebral), 및 관절내(intraarticular)), 국소(topical) (예컨대, 피부 및 점막 표면들 둘 다에, 기도 표면들, 그리고 경피(transdermal) 투여를 포함하여), 림프액-안으로(intro-lymphatic), 등을 포함한다. 투여는 또한 종양(예컨대, 종양 또는 림프절 안 또는 근처)로 할 수 있다. 임의의 주어진 경우에서 가장 적합한 루트는 사용되는 특정 벡터의 특성 및 치료되는 질환의 심각도 및 본질에 의존할 것이다.

[0052] 몇몇 예들에서, 여기에서 개시된 rAAVRec3 벡터들은 예컨대, 뇌 또는 척수인, CNS로 직접적으로 투여된다. CNS로 직접적으로 벡터들을 투여하기 위하여 그 분야에서 알려진 임의의 방법이 사용될 수 있다. rAAV 벡터는 척수, 뇌간(brainstem) (연수(medulla oblongata), 교뇌(pons)), 중간뇌(midbrain) (시상하부(hypothalamus), 시상(thalamus), 시상상부(epithalamus), 뇌하수체(pituitary gland), 흑색질(substantia nigra), 솔방울샘(pineal gland)), 소뇌(cerebellum), 종뇌(telencephalon) (후두(occipital), 측두(temporal), 두정(parietal) 및 전두(frontal) 엽들(lobes), 피질(cortex), 기저핵(basal ganglia), 해마(hippocampus) 및 편도(amygdala)를 포함하는 대뇌(cerebrum), 선조체(corpus striatum)), 변연계(limbic system), 새곁질(neocortex), 선조체(corpus striatum), 대뇌(cerebrum), 및 하구(inferior colliculus) 내로 도입될 수 있다. rAAV 벡터는 예컨대, 허리천자(lumbar puncture)에 의하여, 뇌척수액 내로 전달(deliver)될 수 있다. 게다가, 투여가 정맥내로 수행될 때, 초음파가 rAAV 벡터들의 흡수를 위하여 타겟 위치에서 환자의 혈액 뇌 관문의 투과성을 향상시키기 위하여 환자의 뇌에서 타겟 위치에 적용될 수 있다. 환자의 혈액 뇌 관문의 투과성을 향상시키기 위한 초음파의 적용은 그것의 내용이 그 전체가 여기에 통합되는, Serial No. 62/471,635에 개시되어 있다.

[0053] 한 측면에서, 하나 이상의 약학적으로-허용가능한 첨가제들, 담체들, 희석제들, 아쥬반트들, 및/또는 요소들과 함께 여기에 기재된 유전적으로-변형된 rAAV 벡터 조성물들 중 하나 이상을 포함하는 키트들이 특정 rAAV 전달(delivery) 제제들의 제형화에, 그리고 대상, 그리고 특히, 인간에게 투여를 위하여 치료적 제제들의 제조에서, 이용될 수 있다. 특히, 이러한 키트들은 대상에서 이러한 장애들의 치료에서 바이러스 벡터를 이용하기 위하여 지침과 함께 조합하여 개시된 rAAV 조성물들 중 하나 이상을 포함할 수 있고, 보통 종래의 상업적 패키징을 위하여 제조된 용기들을 더 포함할 수 있다. 이러한 키트들을 위한 용기 수단들은 보통 적어도 하나의 바이알, 테스트 튜브, 플라스크, 병, 주사기 또는 그 안으로 개시된 rAAV 조성물(들)이 놓여질 수 있고, 바람직하게는 적합하게 분취(aliquoted)되는, 다른 용기 수단들을 포함할 수 있다. 두 번째 치료적 폴리펩타이드 조성물이 또한 제공되는 곳에, 키트는 또한 그 안으로 이 두 번째 조성물이 위치될 수 있는 두 번째 구별되는 용기 수단들을 포함할 수 있다. 대체하여, 수많은 치료적 생물학적으로 활성인(active) 조성물들이 단일 약학적 조성물로 제조될 수 있고, 그리고 바이알, 플라스크, 주사기, 병, 또는 다른 적절한 단일 용기 수단들과 같은 단일 용기 수단들에서 포장될 수 있다. 여기에서 개시된 키트들은 또한 보통 예컨대, 주사 또는 그 안에서 원하는 바이알(들)이 보유되는 블로우-성형(molded)된 플라스틱 용기들과 같은 상업적 판매를 위한 폐쇄된(close confinement) 바이알(들)을 포함하기 위한 수단들을 포함할 것이다.

[0054] 다르게 정의되지 않는 한, 여기에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 이 공개가 속하는 분야에서 당업자에 의하여 보통 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 여기에서 기재된 그것들과 유사하거나 또는 등가인 물질들 및 방법들이 본 공개의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있음에도 불구하고, 적합한 방법들 및 물질들이 여기에서 기재된다.

[0055]

6. 실시예들

[0056] 여기에서 제공된 예들은 여기의 공개를 증가시키기 위하여만 포함되며, 어떠한 면에서도 제한하는 것으로 고려되어서는 안된다.

[0057]

실시예 1

[0058] rAAVRec1-4의 이식유전자 발현이 선조체내(intrastriatal) 주사 후 다른 자연적인 혈청형들 (AAV1, AAV8, AAV9)에 비교되었다. 녹색(green) 형광(fluorescent) 단백질 (GFP) 유전자를 추진시키는(driving) CAG 프로모터를 포함하는 발현 카세트가 모든 벡터들에서 사용되었다. 이식유전자 발현은 GFP 형광의 편향없는(unbiased) 입체논리적(stereological) 분석에 의하여 평가되었다. 연구된 벡터들 중에서, rAAVRec3 벡터들이 휘도(luminance) 측정에 의하여 결정된 대로의 주사 부위에서 발현의 가장 높은 레벨을 생산하였다. rAAVRec3는 또한 가장 큰 형질도입 부피를 가졌고 AAV9 및 rAAVRec4가 그 뒤를 이었다. rAAVRec3 벡터는 현재 인기있는 자연적인 변종들보다 개선된 특성들을 보이며, 신경학적 장애들에 대한 유전자 치료를 위하여 높은 잠재성을 가질 수 있다.

[0059]

물질들 및 방법들

[0060]

AAV 벡터들

[0061]

세 개의 영장류(primate)-유래된 AAV 변종들, cy5 (시노몰구스 마카쿠(cynomolgus macaque) - 변종 5), rh20

(레수스 마카쿠(rhesus macaque) - 변종 20) 및 rh39 는 원래 Guang-Ping Gao and the Gene Therapy Program Vector Core, Department of Medicine, University of Pennsylvania로부터 수득되었다. 세 개의 변종들이 그것들의 우수한 형질도입 효율 (Lawlor et al., 2009) 때문에 선택되었다. 하이브리드 재조합 캡시드들의 발생을 위하여, AAV8 및 세 개 모두의 벡터들에서 매치된 캡시드 서열들의 단편들이 (Charbel Issa et al., 2013)에 기재된 대로 알려진 제한 부위들을 이용함으로써 설플(shuffled around)되었다. 하이브리드 AAV 벡터들을 만들어내기 위하여, GFP 이 AAV-도치된 말단 반복들의 옆에 위치한(flanked) 소(bovine) 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호 및 우드Chuck 간염(hepatitis) 바이러스 전사후(posttranscriptional) 조절(regulatory) 요소 (WPRE)를 포함하고 그리고 CAG (hybrid CMV-chicken β -actin) 프로모터의 통제 하 AAV 발현 플라스미드 내로 클로닝되었다. 인간 배아 신장 293 세포들이 표준 CaPO4 형질주입(transfection)을 이용하여 - 아데노바이러스 헬퍼 pF Δ 6 및 rep 및 cap (Rec1-4) 유전자들 또는 AAV1, AAV8, AAV9을 코드하는 적절한 헬퍼 플라스미드, AAV 플라스미드 - 세 개의 플라스미드들로 공동(co)-형질주입(ransfект)되었다. rAAV 벡터들이 이오딕산을 (iodixanol) 밀도(density) 구배(gradiant)를 통하여 초원심분리(ultracentrifugation)에 의하여 세포 용해물로부터 정제되었다. 벡터들은 실시간 PCR을 이용하여 적정되고(tittered)(ABI Prism 7700; Applied Biosystems, Foster City, CA) 주사를 위하여 1.0×10^{13} 벡터 계놈들 (vg)/mL 으로 회석되었다.

- [0063] AAV 역가(titer) 비교
- [0064] 각 혈청형 바이러스가 다섯 개의 150 mm 플레이트들에서 생산되었다. 각 플레이트로부터 각 벡터 스톡의 바이러스 계놈 역가(titer)가 실시간 PCR에 의하여 결정되었고, 각 플레이트에서 바이러스 수율 (세포 당 바이러스 계놈 입자들 vg/세포)이 계산되었다.
- [0065] 마우스들
- [0066] 십사 주령 수컷 C57BL/6 마우스들 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA)이 임의로 물 및 먹이와 함께 12 시간 명/암 사이클 (1800 hr에서 소등) 하 그룹들로 수용되었다. 동물들의 모든 사용은 Ohio State University Animal Care and Use Committee에 의하여 승인받았으며, NIH 가이드라인들에 따랐다.
- [0067] 선조체로 rAAV 주사
- [0068] 마우스들은 케타민(ketamine)/자일라진(xylazine) (100mg/kg 및 20mg/kg; i.p.)의 단일 복용량(dose)으로 마취되었고 Kopf 입체공간적(stereotaxic) 틀(frame)에 위치되었다. 선조체(striatum)에 대한 주사 좌표들은 (정수리점(bregma) 부터): 앞쪽(anterio)-뒷쪽(posterior) +1.0mm; 내외(medio-lateral), ± 1.7 mm; 배복(dorsal-ventral), -3.5mm (Franklin and Paxinos, 1997). Micro4 Micro Syringe Pump Controller (World Precision Instruments Inc., Sarasota, USA)에 부착된 10 μ L Hamilton 주사기를 이용하여, 1 μ L AAV 벡터 (1×10^{13} vg/mL)가 양 방향으로 등쪽 및 배쪽 해마(hippocampus) 둘 다의 안으로 전달(deliver)되었다. 동물들은 수술-후 마취에서 회복될 때까지 모니터링되었다.
- [0069] 면역조직화학을 위한 조직 제조
- [0070] 벡터 주사 4 주 후, 마우스들이 소듐 펜토바비톤 과용량 (20 μ L, i.p.)으로 회생되었고 1xPBS 및 뒤이어 4% PFA로 경심관류로(transcardially) 관류되었다. 30% 수크로스에서 한랭보호(cryoprotection) 후, 40 μ m의 관상(coronal) 뇌 절편들이 면역조직화학을 위한 저온유지장치(cryostat)로 절단되었다.
- [0071] 면역조직화학
- [0072] 뇌 절편들은 0.25% Triton X-100 (PBST)을 포함하는 1 \times PBS에서 씻어졌고(rinse) 1% 혈청을 포함하는 PBST에서 실온에서 1 시간 동안 차단되었다. 차단 버퍼의 제거 후, 절편들은 토끼 항-NeuN 항체 (Abcam, 1:500) 또는 염소 항-GFAP 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., 1:100)으로 밤새 4°C에서 배양되었다. 다음 날, 절편들은 PBST로 완전히 세척되었고 3 시간 동안 이차 항체들, Cy3-콘쥬게이트된(conjugated) 염소 항-토끼 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., 1:250) 또는 당나귀 항-염소 IgG-TR (Santa Cruz Biotechnology, Inc., 1:250)로 배양되었다. 절편들은 그 다음에 씻어졌고(rinse), 슬라이드들 위에 올려지고, 형광(fluorescent) 고정(mounting) 배지(medium) (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)로 커버(cover) 슬립되었다(slip).
- [0073] 동일초점 현미경(Confocal Microscopy)
- [0074] 뇌 절편들은 동일초점 현미경(confocal microscope) (Olympus FluoView™ FV1000, Tokyo, Japan)에서 시각화되

었다. GFP, Cy3 및 Texas Red®의 형광이 488 nm 아르곤 레이저 및 543 nm HeNe 레이저를 이용하여 연속적으로 흥분되었다. 이미지들은 $\times 40$ 오일(oil) 액침(immersion) 대물렌즈(objective lens)를 이용하여 연속적으로 수집되었다. Olympus Viewer가 병합된 이미지들을 만들어내는데 이용되었다.

[0075] 입체학

뇌 조직의 형질도입 부피(volume)가 Stereo Investigator 7 (MBF Bioscience, Willeston, VT)에서 Cavalier Estimator을 이용하여 입체논리적으로 정량화되었다. GFP-양성 면역반응성을 포함하는 각 절편의 부분이 윤곽이 드러났고 마커들은 각 절편 내 형질도입의 부분을 추정하기 위하여 100 μm 의 그리드(grid) 크기로 위치되었다. 모든 12th 40 μm 절편에서 부분이 (이식유전자 발현에 의존하여, 측정된 뇌 당 10-12 절편들) 측정되었고, 그 다음에 평균 내었고 형질도입 부피의 추정을 주기 위하여 첫 번째 및 마지막 절편들 사이의 상하방향(rostrocaudal) 거리에 의하여 곱해졌다.

[0077] GFP 발현의 휘도

각 뇌 조직에서 발현된 GFP 강도는 Collect Luminance Information command in Stereo Investigator 7 (MBF Bioscience, Willeston, VT)을 이용하여 측정되었다. 각 뇌에 대한 가장 강렬한 형광을 가진 절편의 이미지가 얻어졌고 GFP-발현하는 부분이 윤곽이 드러났다. 윤곽(contour) 내 각 픽셀의 휘도가 측정되었고 그 다음에 평균내어졌다. 휘도는 각 픽셀에 대하여 0 부터 255 까지 범위를 갖는다. 검은 픽셀은 0 의 휘도를 갖는 반면, 하얀 픽셀은 255의 휘도를 갖는다. 색깔 픽셀들을 위하여, 휘도는 $(0.299*\text{Red}) + (0.579*\text{Green}) + (0.114*\text{Blue})$ 으로 정의된다.

[0079] 통계 분석

다른 실험군들로부터의 평균 값들이 일-방향 ANOVA를 이용하여 그리고 그 뒤에 이은 Student t-검정에 의한 짹방향(pair-wise) 비교에 의하여 비교되었다. 모든 통계적 분석은 $P < 0.05$ 에서 중요성 세팅으로 JMP 소프트웨어 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 이루어졌고, 모든 데이터들은 평균 \pm 평균의 표준오차 (standard error of the mean) (S.E.M)로 나타내어진다.

[0081] 결과들

네 개의 영장류-유래된 하이브리드 재조합 AAV 벡터들 (AAVRec1-4)의 형질도입 효율이 마우스 뇌에서 야생형 캡시드들 (AAV1, AAV8, AAV9)로 위형된(pseudotyped) 벡터들에 비교되었다. 선조체(striatum) 내 GFP-발현된 조직의 부피가 편향없는(unbiased) 입체논리적(stereological) 방법들에 의하여 정량화되었다. 결국, rAAVRec3 및 AAV9 이 가장 광범위한 GFP 발현을 보였고, rAAVRec4가 그 뒤를 이었다. (도 2: 일방향(One-way) ANOVA, $P < 0.0001$). rAAVRec1 및 rAAVRec2가 AAV1에 비교할만한 형질도입 부피들을 생산하였고, AAV8 이 가장 작은 형질도입 부피를 보였다. 강렬한 GFP 형광이 또한 AAV9, rAAVRec3 및 rAAVRec4 주사된 뇌들의 창백핵(globus pallidus), 시상, 피질(cortex) 및 시상에서 관찰되었다. rAAVRec3 주사된 뇌들의 더 상세한 실험은 반대쪽(contralateral) 주사되지 않은 선조체(striatum)에서, 창백핵(globus pallidus)에서, 그리고 흑색질(substantia nigra)에서 GFP 양성 섬유들을 드러내었다. 게다가, GFP 양성 세포들이 시상 및 피질(cortex)에서 관찰되었다. 이러한 피질(cortical) 및 시상(thalamic) 세포들 형질도입은 피질선조체(corticostriatal) 및 시상선조(thalamostriatal) 구심들(afferents)을 통해 벡터의 역행하는 이동을 통하여 일어날 수 있다. 형질도입된 피질(cortical) 및 시상(thalamic) 뉴런들은 주사부위로부터 1 mm 떨어진 곳까지 검출되었는데, 이는 바이러스 용액의 단순한 확산에 의하여 설명되기에에는 너무 멀다고 여겨지는 거리이다(Aschauer et al., 2013).

흥미롭게도, 시험된 벡터들 중 가장 높은 효율을 갖고 갈색 및 흰색 지방 조직들 둘 다를 형질도입하는 것으로 최근 보여진, 새로운 혈청형 rAAVRec2는 (Liu et al., 2014), 뇌를 타겟으로 하는 이식유전자 전달(delivery)을 개선하지 않았다. 대조적으로, rAAVRec3, rAAVRec4 및 AAV9 는 높은 효율로 뇌를 형질도입하지만, 지방 조직들은 형질도입을 잘하지 못한다. 이들 조작된 혈청형들의 구별되는 조직 향성(tropism)은 기초 연구 및 임상 적용 둘 다에 대한 현재의 AAV 벡터 수단(toolkit)을 확장하는데 유용한 특징이다.

여러가지 혈청형들에 의한 이식유전자 발현의 강도를 비교하기 위하여, 각 뇌로부터 가장 강렬한 GFP 형광을 가진 절편이 선택되었고, 휘도가 측정되고 평균내어졌다. rAAVRec3 은 가장 높은 GFP 형광 강도를 보였는데, 이는 AAV8에 의하여 매개된 것보다 2-배(fold) 더 높았다 (도 2A). rAAVRec4-매개된 이식유전자 발현은 AAV9와 비슷하였다. 그 결과들은 타겟 부위에서 달성된 이식유전자 단백질 발현의 최대 레벨이 rAAVRec3 벡터들을 이용한 것보다 더 높았다는 것을 가리킨다. 이것은 새로운 하이브리드 재조합 혈청형으로 형질도입의 더 높은 밀도

(mm³ 당 형질도입된 세포들) 또는 형질도입된 세포들 내 증가된 이식유전자 발현 때문일 수 있었다.

[0085] rAAVRec1-4의 세포 향성(tropism)을 결정하기 위하여, 공동초점 현미경이, 별아교세포들(astrocytes) (GFAP) 및 뉴런들 (NeuN)에 대하여 세포-종류-특이적 애피토프들에 대항하여 항해지는 항체들을 이용하여 다른 신경 세포 종류들에 다른 세포 마커들의 면역형광(immunofluorescence) 및 GFP 형광의 공동(co)-위치측정(localization)을 시각화하는데 사용되었다. 시험된 혈청형들 모두로, 가장 많은 수의 GFP-양성 세포들이 각 절편 당 2-3 겹출가능한 별아교세포(astrocytic) 특이적 GFAP-양성 세포들로 뉴런(neuronal) 마커 NeuN으로 면역 반응성이었는데 (도 3), 이는 rAAVRec 1-4 가 대부분 뉴런들을 형질도입한다는 것을 가리킨다. 예상한 대로, rAAVRec1-4 는 세포 향성(tropism)을 변화시키지 않았고, 이는 형질도입된 세포들이 사용된 프로모터에 현저히 의존한다는 사실과 일치한다 (Lawlor et al., 2009). AAV 벡터들에 의한 별아교세포들의 형질도입은 신경교(glial)-특이적 프로모터들의 편입(incorporation)을 요구할 수 있다. 게다가, 뇌 영역은 또한 다른 AAV 혈청형들의 ltpvh 향성(tropism)에 영향을 미칠 수 있다. 예컨대, Aschauer 및 동료들은 (2013) 대뇌(cortex)에서 별아교세포들이 AAV6 벡터들에 비하여 AAV8로 형질도입된 후 더 높은 GFP 레벨들을 보인 반면, 별아교세포의(astrocytic) 형질도입의 이 차이는 해마에서는 관찰되지 않았다고 최근 보였다 (Aschauer et al., 2013). 흥미롭게도, AAV8이 별아교세포들 및 회소돌기아교세포들(oligodendrocytes)을 형질도입할 수 있었고 AAV1 이 미세아교세포(microglia)의 일부 형질도입을 보였다는 것을 동일한 연구가 보여주었다. 이는 사용된 다른 방법의 반영일 수 있었다. 우리가 형질도입 패턴의 더 질적인 기재를 보고하는 반면 (도 3), Aschauer et al.은 다른 세포 종류들의 각 형질도입된 세포들 내에서 GFP 신호 강도를 양적으로 평가하였고, 그러므로 높은 신호 강도를 가진 적은 수의 세포들도 높은 세포-종류 특이적 발현을 이끌 수 있다. 그럼에도 불구하고, 그 결과들은 rAAVRec3과, 네 개의 rAAVRec 벡터들의 신경친화성(neurotropic) 특성을 명백히 입증하며, 또한 별아교세포들에 대한 중간의 향성(tropism)을 입증한다 (도 3). 이를 하이브리드 벡터들의 생산 동안, 다른 벡터들이 동일한 사람에 의한 동일한 생산 방법들 (ANOVA, P <0.0001로 분석된 전체적인 차이)에도 불구하고 다른 생산 수율을 이근다는 것이 주목되었다. 결과들은 표 1에 나타내어진다.

표 1

혈청형	역가 ($\times 10^5$ 바이러스 계놈/세포)	Student t-검정으로 결정된 대로, 중요하게 다른 그룹들($P < 0.05$)
AAV1	0.38 ± 0.10	AAVRec1, AAVRec2, AAVRec3
AAV8	0.63 ± 0.14	AAVRec1, AAVRec2,
AAV9	0.15 ± 0.05	AAVRec1, AAVRec2, AAVRec3
AAVRec1	1.32 ± 0.21	AAVRec4, AAV1, AAV8, AAV9
AAVRec2	1.70 ± 0.33	AAVRec4, AAV1, AAV8, AAV9
AAVRec3	1.25± 0.18	AAVRec4, AAV1, AAV9
AAVRec4	0.63 ± 0.13	AAVRec1, AAVRec2, AAVRec3

벡터 역가들(titers)

[0087] 특이적으로, rAAVRec2 및 rAAVRec1는 다른 벡터들에 비하여 가장 큰 수율을 보였다. rAAVRec3 역가(titer)가 AAV8보다 거의 2-배 더 높음에도 불구하고, 그 차이는 통계적 중요성에는 도달하지 않았다. 특히, AAV9가 뇌에서 매우 효율적인 형질도입을 생산하였음에도 불구하고, 생산된 역가(titer)는 rAAVRec3 보다 8-배 초과로 더 낮았다 ($P <0.001$). 증가된 수율은 그것이 동일한 생산 비용에 대하여 더 큰 형질도입 부피로 바꾸어지기 때문에, 실용적 관련성을 갖는다.

[0088] 다른 AAV 혈청형들 사이의 바이러스 캡시드 단백질 서열들을 상호교환함으로써 만들어지는 본 rAAV 벡터들은 향상된 형질도입 효율 및 더 좋은 생산 수율을 제공할 수 있다. 본 하이브리드 벡터들은 재-투여를 위한 두 번째 벡터로서 면역 반응들을 피하는 것에 사용될 수 있다. 이를 하이브리드 벡터들은 현재의 AAV 툴킷(toolkit)를 더 확장하며 신경학적 연구를 위한 유용한 생물학적 도구들이다.

[0089] 여기에서 제공된 실시예들 및 예들이 예씨적인 실시예들 예들이라는 것이 이해되어야 할 것이다. 당업자는 여기의 공개의 범위와 일치하는 실시예들 및 예들의 여러가지 변형들을 상상할 것이다. 이러한 변형들은 특히청구범위에 의하여 포함되는 것으로 의도된다.

[0090] 명세서에서 내내 언급된 모든 특허들, 특허출원들 및 참고문헌들은 참고로서 분명히 통합된다.

참고문헌들

- [0092] 참고문헌들
- [0093] 1. Srivastava A, Lusby EW, Berns KI. 1983. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol* 45:555-564.
- [0094] 2. Xiao X, Li J, McCown TJ, Samulski RJ. 1997. Gene transfer by adeno-associated virus vectors into the central nervous system. *Exp Neurol* 144:113-124.
- [0095] 3. Hermonat PL, Labow MA, Wright R, Berns KI, Muzyczka N. 1984. Genetics of adeno-associated virus: isolation and preliminary characterization of adeno-associated virus type 2 mutants. *J Virol* 51:329-339.
- [0096] 4. Timpe J, Bevington J, Casper J, Dignam JD, Trempe JP. 2005. Mechanisms of adeno-associated virus genome encapsidation. *Curr Gene Ther* 5:273-284.
- [0097] 5. Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ. 2000. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* 74:2777-2785.
- [0098] 6. Gao G, Vandenberghe LH, Wilson JM. 2005. New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther* 5:285-297.
- [0099] 7. Grimm D. 2002. Production methods for gene transfer vectors based on adeno-associated virus serotypes. *Methods* 28:146-157.
- [0100] 8. Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X, Samulski RJ. 2002. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 76:791-801.
- [0101] 9. Summerford C, Samulski RJ. 1998. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 72:1438-1445.
- [0102] 10. Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A. 1999. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 5:71-77.
- [0103] 11. Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. 1999. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 5:78-82.
- [0104] 12. Kaludov N, Handelman B, Chiorini JA. 2002. Scalable purification of adeno-associated virus type 2, 4, or 5 using ion-exchange chromatography. *Hum Gene Ther* 13:1235-1243.
- [0105] 13. Di Pasquale G, Davidson BL, Stein CS, Martins I, Scudiero D, Monks A, Chiorini JA. 2003. Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat Med* 9:1306-1312.
- [0106] 14. Samulski RJ, Chang LS, Shenk T. 1989. Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 63:3822-3828.
- [0107] 15. Carter BJ. 2005. Adeno-associated virus vectors in clinical trials. *Hum Gene Ther* 16:541-550.
- [0108] 16. Fisher KJ, Jooss K, Alston J, Yang Y, Haecker SE, High K, Pathak R, Raper SE, Wilson JM. 1997. Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat Med* 3:306-312.
- [0109] 17. Kaplitt MG, Leone P, Samulski RJ, Xiao X, Pfaff DW, O'Malley KL, During MJ. 1994. Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat Genet* 8:148-154.
- [0110] 18. Koeberl DD, Alexander IE, Halbert CL, Russell DW, Miller AD. 1997. Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1426-1431.
- [0111] 19. McCown TJ, Xiao X, Li J, Breese GR, Samulski RJ. 1996. Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adeno-associated virus (AAV) vector. *Brain Res* 713:99-107.

- [0112] 20. Flannery JG, Zolotukhin S, Vaquero MI, LaVail MM, Muzyczka N, Hauswirth WW. 1997. Efficient photoreceptor-targeted gene expression in vivo by recombinant adeno-associated virus. Proc Natl Acad Sci U S A 94:6916-6921.
- [0113] 21. Halbert CL, Rutledge EA, Allen JM, Russell DW, Miller AD. 2000. Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated virus vectors with different serotypes. J Virol 74:1524-1532.
- [0114] 22. Senut MC, Suhr ST, Kaspar B, Gage FH. 2000. Intraneuronal aggregate formation and cell death after viral expression of expanded polyglutamine tracts in the adult rat brain. J Neurosci 20:219-229.
- [0115] 23. Smith-Arica JR, Thomson AJ, Ansell R, Chiorini J, Davidson B, McWhir J. 2003. Infection efficiency of human and mouse embryonic stem cells using adenoviral and adeno-associated viral vectors. Cloning Stem Cells 5:51-62

도면

도면1a

Rec2/ Rec3/ AAV2/ AAV5 VP protein alignment

Rec2	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDDRGLVLPGYKYLGPNGLD	60
Rec3	MAADGYLPDWLEGNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDDRGLVLPGYRILGPNGLD	60
AAV2	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREQWKLKGAPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPNGLD	60
AAV5	MSFVDHPPDWLE-EVGEGLREFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNLYLGPNGLD	59
	VP1	
	<i>StuI</i>	
Rec2	KGEPVNAADAAALE HDKAY DQQLKAGDNPYLRYNHDAEFAQERLQED T SFGGNLGRAVFQ	120
Rec3	KGEPVNEADAAALE HDKAY DQQLKAGDNPYLRYNHDAEFAQERLQED T SFGGNLGRAVFQ	120
AAV2	KGEPVN EADAAALE HDKAY DRQLDSDGDNPYLKYNHDAEFAQERLKED T SFGGNLGRAVFQ	120
AAV5	RGEPVNRADEVARE HDISY NQEAGDNPYLKYNHDAEFAQEKLADD T SFGGNLGRAVFQ	119
	PLA2	VP2
Rec2	AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPORSPDSSTGIGKTGQO PAKKRLNF QGTGDS	180
Rec3	AKKRVLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEPSPORSPDSSTGIGKKQO PAKKRLNF QGTGDS	180
AAV2	AKKRVLEPLGLVEEVPKTAPGKKRPVEHSPV-EPDSSSGTQKAGQ PAKKRLNF QGTGDA	179
AAV5	AKKRVLEPFGLVVEEGAKTAPTKRIDDHFPKRKART---EEDSKPS-----TSSDA	168
	NLS	
Rec2	ESVPDPQPIGEPPAGP-SGLGSGT MA AGGGAPMADNNNEGADGVGSSGNWHCDSTWLDRV	240
Rec3	ESVPDPQPIGEPPAGP-SGLGSGT MA AGGGAPMADNNNEGADGVGSSGNWHCDSTWLDRV	240
AAV2	DSVPDPQPLQOPPAAP-SGLGNT MT GSGAPMADNNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRV	239
AAV5	EAGPSGSQQLQIOPAQPASSLGADT MS AGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHDCHCDSTWMGDRV	229
	VP3	
Rec2	ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ	300
Rec3	ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ	300
AAV2	ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQ-S-GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ	297
AAV5	VTKSTRTWLPSYNNHQYREIKSGSVDGS-NANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQ	288
Rec2	RLINNNWGFRPKRLNFKLFNIVQKEVTQNEGKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSA	360
Rec3	RLINNNWGFRPKRLSFKLFNIVQKEVTQNEGKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSA	360
AAV2	RLINNNWGFRPKRLNFKLFNIVQKEVTQNDGTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSA	357
AAV5	RLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTQDSTTIANNLTVQVFTDSEYQLPYVLGNG	348
Rec2	HQGCLPPFPADVFMI PQYGYTLN--NGSQAVGRSSFYCLEYFPQSMLRTGNNEFQFED	420
Rec3	HQGCLPPFPADVFMI PQYGYTLN--NGSQAVGRSSFYCLEYFPQSMLRTGNNEFQFED	420
AAV2	HQGCLPPFPADVFMPVQYGYTLN--NGSQAVGRSSFYCLEYFPQSMLRTGNNEFTSYTFED	417
AAV5	TEGCLPAFPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSFFCLEYFPSKMLRTGNNEFTYNFEE	410
Rec2	VPFHSSYAHQSLSRDLMNPLIDQYLYYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNMSAQAKNW	480
Rec3	VPFHSSYAHQSLSRDLMNPLIDQYLYYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNMSAQAKNW	480
AAV2	VPFHSSYAHQSLSRDLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTQSRLQFSQAGASDIRD QSRNW	477
AAV5	VPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGG-----VQFNKNLAGRYANTYKNW	464
	MluI	
Rec2	LPGPCYRQQRVSTTTGQNNNSNFAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDEERFFPSN	540
Rec3	LPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLNVPGVAMATHKDDEERFFPSS	540

FIG. 1A

도면1b

AAV2 LPGPCY**R****R**VSCTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDE**K**FFPQS 537
 AAV5 FPGPMGRQGWNLGSGVNRAVS AFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALE 524

Rec2 GILIFGKQNA-ARDNADY-SDVML-TSEEEIKTTNPVATEEYGIVADNLQQQNTAPQIGTVNS 600
 Rec3 GVLMEFGKQGA-GRDNVDY-SSVML-TSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQTNTGPIVGTVNS 600
 AAV2 GVLIFGKQGS-EKTNVDI-EKVM -TDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNL**R****G****N****D**AATADVNT 597
 AAV5 NTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNL 587

R 484, 487, 585, 588 and **K** 532 – heparin binding domain

BamHI

Rec2 QGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVP**ADP** 660
 Rec3 QGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVP**ADP** 660
 AAV2 QGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVP**ANP** 657
 AAV5 QEIVPGSVWMERDVYLQGPIWAKIPTGAHFHPSPAMGGFGLKHPPPMILIKNTPVP**GN-** 647

Rec2 **PTTFNQSKLN**SFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTE 720
 Rec3 **PTTFNQSKLN**SFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTE 720
 AAV2 **STTFSAAKFAS**FITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTE 717
 AAV5 **ITSFSDVPVS**SFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNYYNDPQFVDFAPDST 706

HI loop

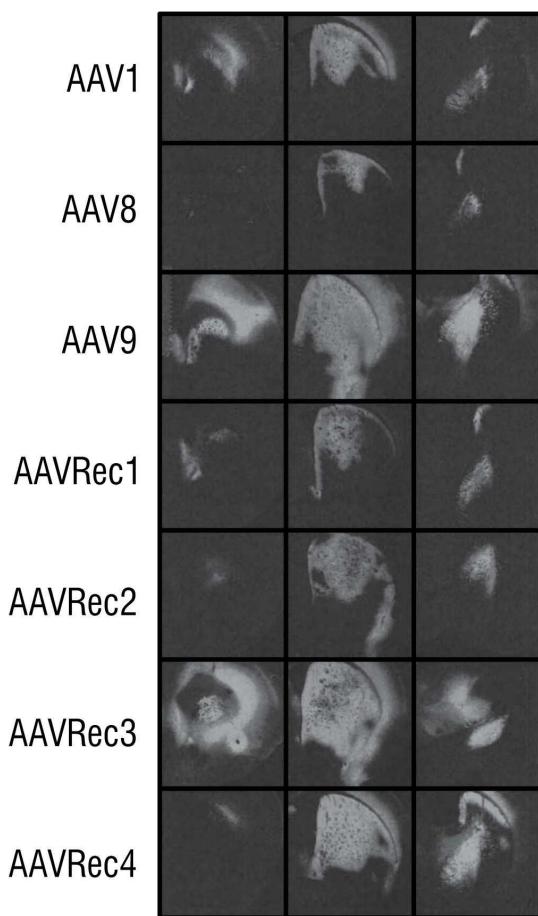
Rec2 GVYSEPRPIGTRYLTRNL 738
 Rec3 GVYSEPRPIGTRYLTRNL 738
 AAV2 GVYSEPRPIGTRYLTRNL 735
 AAV5 GEYRTTRPIGTRYLTRPL 724

FIG. 1A (cont.)

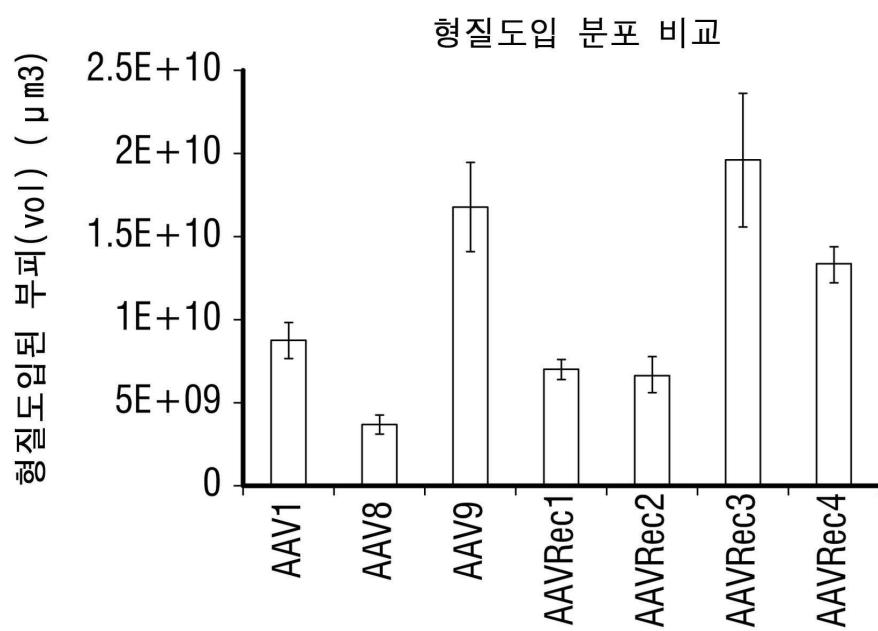
도면1c

FIG. 1B

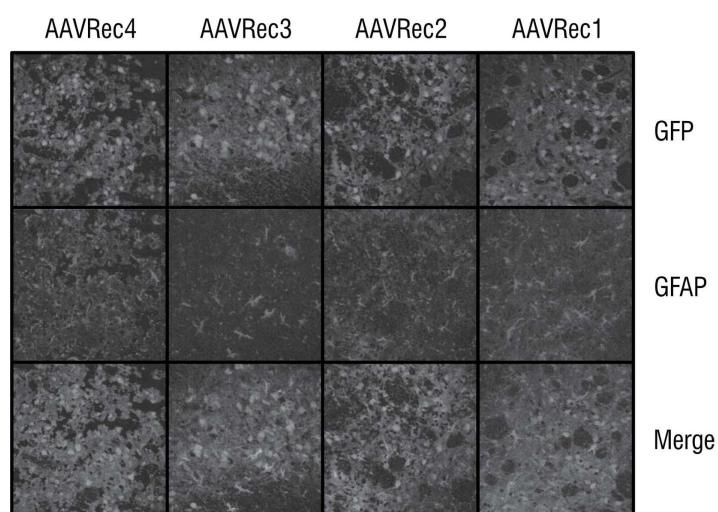
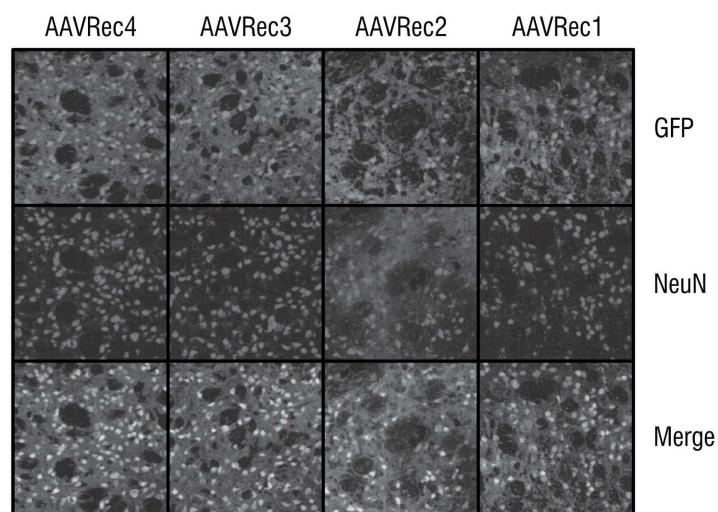
도면2a



도면2b



도면3



서 열 목록

- <110> OVID THERAPEUTICS INC.
 DURING, Matthew
- <120> RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VECTORS
- <130> 2662-48
- <140> US 16/108,393
- <141> 2018-08-22
- <150> US 62/550,458
- <151> 2017-08-25
- <160> 5
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 738

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: rAAVRec2

<400> 1

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser

1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro

20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro

35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro

50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala

85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly

100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro

115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg

130 135 140

Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile

145 150 155 160

Gly Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln

165 170 175

Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro

180 185 190

Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly

195 200 205

Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser

210 215 220

Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val

225 230 235 240

Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His

245 250 255

Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp

260 265 270

Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn

275 280 285

Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn

290 295 300

Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn

305 310 315 320

Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala

325 330 335

Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln

340 345 350

Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe

355 360 365

Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn

370 375 380

Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr

385 390 395 400

Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr

405 410 415

Gln Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser

420 425 430

Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu

435 440 445

Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu

450 455 460

Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp

465	470	475	480
Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Gly			
485	490	495	
Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Ala Gly Thr Lys Tyr His			
500	505	510	
Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro Gly Ile Ala Met Ala Thr			
515	520	525	
His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Asn Gly Ile Leu Ile			
530	535	540	
Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn Ala Asp Tyr Ser Asp Val			
545	550	555	560
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr			
565	570	575	
Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Thr Ala			
580	585	590	
Pro Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val			
595	600	605	
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile			
610	615	620	
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe			
625	630	635	640
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val			
645	650	655	
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ser Lys Leu Asn Ser Phe			
660	665	670	
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu			
675	680	685	
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr			
690	695	700	
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Ser Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu			
705	710	715	720
Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg			

725

730

735

Asn Leu

<210> 2

<211> 738

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: rAAVRec3

<400> 2

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Gly Asn Leu Ser

1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro

20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro

35 40 45

Gly Tyr Arg Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro

50 55 60

Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala

85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly

100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro

115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg

130 135 140

Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile

145 150 155 160

Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln

165 170 175

Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro

180	185	190
Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly		
195	200	205
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser		
210	215	220
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val		
225	230	235
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His		
245	250	255
Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp		
260	265	270
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn		
275	280	285
Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn		
290	295	300
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn		
305	310	315
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala		
325	330	335
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln		
340	345	350
Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe		
355	360	365
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn		
370	375	380
Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr		
385	390	395
Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr		
405	410	415
Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser		
420	425	430

Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
 435 440 445
 Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Gln Gly Thr Gln Gln Leu Leu
 450 455 460
 Phe Ser Gln Ala Gly Pro Ala Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp
 465 470 475 480

 Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser
 485 490 495
 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His
 500 505 510
 Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr
 515 520 525
 His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
 530 535 540
 Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val

 545 550 555 560
 Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
 565 570 575
 Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Thr Asn Thr Gly
 580 585 590
 Pro Ile Val Gly Asn Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
 595 600 605
 Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
 610 615 620

 Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
 625 630 635 640
 Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val
 645 650 655
 Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ser Lys Leu Asn Ser Phe
 660 665 670
 Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu
 675 680 685

Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr

690	695	700
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Ser Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu		
705	710	715
Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg		
	725	730
Asn Leu		

<210> 3
<211> 735
<212> PRT
<213> Adeno-associated virus
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(735)
<223> AAV2
<400> 3

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser

1	5	10	15
Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro			
20	25	30	
Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro			
35	40	45	
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro			
50	55	60	
Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp			
65	70	75	80

Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala			
	85	90	95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly			
	100	105	110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro			
	115	120	125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140
 Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly

 145 150 155 160
 Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175
 Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro
 180 185 190
 Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly
 195 200 205
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
 210 215 220

 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255
 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
 260 265 270
 Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His
 275 280 285
 Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp

 290 295 300
 Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val
 305 310 315 320
 Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu
 325 330 335
 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
 340 345 350
 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
 355 360 365

 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser

370	375	380
Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser		
385	390	395
Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu		
405	410	415
Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg		
420	425	430
Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr		
435	440	445
Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln		
450	455	460
Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly		
465	470	475
Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn		
485	490	495
Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly		
500	505	510
Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp		
515	520	525
Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys		
530	535	540
Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr		
545	550	555
Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr		
565	570	575
Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr		
580	585	590
Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp		
595	600	605
Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr		
610	615	620
Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys		

625 630 635 640

His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn

645 650 655

Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln

660 665 670

Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys

675 680 685

Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr

690 695 700

Tyr Lys Ser Thr Ser Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr

705 710 715 720

Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu

725 730 735

<210> 4

<211> 724

<212> PRT

<213> Adeno-associated virus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(724)

<223> AAV5

<400> 4

Met Ser Phe Val Asp His Pro Pro Asp Trp Leu Glu Glu Val Gly Glu

1 5 10 15

Gly Leu Arg Glu Phe Leu Gly Leu Glu Ala Gly Pro Pro Lys Pro Lys

20 25 30

Pro Asn Gln Gln His Gln Asp Gln Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro Gly

35 40 45

Tyr Asn Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Arg Gly Glu Pro Val

50 55 60

Asn Arg Ala Asp Glu Val Ala Arg Glu His Asp Ile Ser Tyr Asn Glu

65 70 75 80

Gln Leu Glu Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala Asp

85	90	95
Ala Glu Phe Gln Glu Lys Leu Ala Asp Asp Thr Ser Phe Gly Gly Asn		
100	105	110
Leu Gly Lys Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro Phe		
115	120	125
Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Thr Gly Lys Arg Ile		
130	135	140
Asp Asp His Phe Pro Lys Arg Lys Lys Ala Arg Thr Glu Glu Asp Ser		
145	150	155
Lys Pro Ser Thr Ser Ser Asp Ala Glu Ala Gly Pro Ser Gly Ser Gln		
165	170	175
Gln Leu Gln Ile Pro Ala Gln Pro Ala Ser Ser Leu Gly Ala Asp Thr		
180	185	190
Met Ser Ala Gly Gly Gly Pro Leu Gly Asp Asn Asn Gln Gly Ala		
195	200	205
Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr Trp		
210	215	220
Met Gly Asp Arg Val Val Thr Lys Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro		
225	230	235
240		
Ser Tyr Asn Asn His Gln Tyr Arg Glu Ile Lys Ser Gly Ser Val Asp		
245	250	255
Gly Ser Asn Ala Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr		
260	265	270
Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Ser His Trp Ser Pro Arg Asp Trp Gln		
275	280	285
Arg Leu Ile Asn Asn Tyr Trp Gly Phe Arg Pro Arg Ser Leu Arg Val		
290	295	300
Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Val Gln Asp Ser Thr		
305	310	315
320		
Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp		
325	330	335

Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly Cys
 340 345 350
 Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly Tyr
 355 360 365
 Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser Ser
 370 375 380
 Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly Asn
 385 390 395 400

 Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser
 405 410 415
 Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp
 420 425 430
 Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln
 435 440 445
 Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp
 450 455 460
 Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly

 465 470 475 480
 Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu
 485 490 495
 Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr
 500 505 510
 Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile
 515 520 525
 Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu
 530 535 540

 Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg
 545 550 555 560
 Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser Ser
 565 570 575
 Thr Thr Ala Pro Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val Pro
 580 585 590

Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp

595 600 605

Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala Met

610 615 620

Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Met Met Leu Ile Lys Asn

625 630 635 640

Thr Pro Val Pro Gly Asn Ile Thr Ser Phe Ser Asp Val Pro Val Ser

645 650 655

Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Thr Val Glu Met Glu

660 665 670

Trp Glu Leu Lys Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln

675 680 685

Tyr Thr Asn Asn Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Val Asp Phe Ala Pro Asp

690 695 700

Ser Thr Gly Glu Tyr Arg Thr Thr Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu

705 710 715 720

Thr Arg Pro Leu

<210> 5

<211> 2217

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: nucleotide sequence of rAAVRec3 and rAAVRec2

<400> 5

atggcggcgg atggctatct gccggattgg ctggaaggca acctgagcga aggcatcg 60

gaatggtggg atctgaaacc gggcgccgcg aaaccgaaag cgaaccagca gaaacaggat 120

gatggccgcg gcctggtgct gccgggctat cgctatctgg gcccgttaa cggcctggat 180

aaaggcgaac cggtaacga agcggatgca gcggcgctgg aacatgataa agcgtatgat 240

cagcagctga aagcggcga taacccgtat ctgcgtata accatgcgga tgcgaaattt 300

caggaacgcc tgcaggaaga taccagctt ggcggcaacc tggccgcgc ggtgtttcag 360

gcgaaaaaac gcgtgctgga accgctggc ctggtgaaag aagcggcgaa aaccgcgcgg 420

ggcaaaaaac gcccggtgga accgagccg cagcgcagcc cgatagcag caccggcatt	480
ggcaaaaag gccagcagcc ggcgaaaaaaaa cgcctgaact ttggccagac cggcgatagc	540
gaaagcgtgc cgatccgca gccgattggc gaaccgcccgg cggcccgag cggctggc	600
agcggcacca tggcgccgg cggcggcgcg ccgatggcgg ataacaacga aggcgccgat	660
ggcgtggca gcagcagcgg caactggcat tgcgatagca cctggctgg cgatcgcgt	720
attaccacca gcacccgcac ctggcgctg ccgacctata acaaccatct gtataaacag	780
attagcaacg gcaccagcgg cggcagcacc aacgataaca cctattttgg ctatagcacc	840
ccgtgggct atttgattt taaccgctt cattgccatt ttagcccg cgatggcag	900
cgccgtgatta aacaacaactg gggcttcgc ccgaaacgcc tgagcttaa actgttaac	960
attcaggta aagaagtgc ccagaacgaa ggcacaaaaa ccattgcgaa caacctgacc	1020
agcaccattc aggtgtttac cgatagcga tatcagctgc cgtatgtgct gggcagcgc	1080
catcaggct gcctgccc gttccggcg gatgtgtta tgattccgca gtatggctat	1140
ctgaccctga acaacggcag ccaggcggtg ggccgcagca gctttatttgc cctgaaat	1200
tttccgagcc agatgctgcg caccggcaac aacttgaat ttagctatac ctttgaagat	1260
gtgcgttca atagcagcta tgcgcatagc cagagcctgg atgcgcgtat gaacccgctg	1320
attgatcgt atctgtatta tctgagccgc acccagagca cggcggcac ccagggcacc	1380
cagcagctgc tggtagcca ggcggcccg gcgaacatga gcgcgcaggc gaaaaactgg	1440
ctgcccccc cgatgtatcg ccagcagcgc gtgagcacca ccctgagccca gaacaacaac	1500
agcaactttg cgtggaccgg cgcgaccaaa tatcatctga acggccgcga tagcctgg	1560
aacccggcg tggcgatggc gaccataaa gatgatgaag aacgctttt tccgagcgc	1620
ggcgtgctga tggcgatggc acagggcgcg ggccgcgata acgtggatta tagcagcgt	1680
atgctgacca gcgaagaaga aattaaaacc accaaccgg tggcgaccga acagatggc	1740
gtggtggcgg ataacctgca gcagaccaac accggccga ttgtggcaa cgtgaacagc	1800
caggcgcgc tgccggcat ggtgtggcag aaccgcgtat gtatctgca gggcccgatt	1860
tggcgaaaa ttccgcatac cgatggcaac ttcatccga gcccgtgtat gggcggttt	1920
ggcgtgaaac atccggccgc gcagattctg attaaaaaca cccggtgcc ggcgcgtcc	1980
ccgaccaccc ttaaccagag caaactgaac agctttatcca cccagtatag caccggccag	2040
gtgagcgtgg aaattgaat ggaactgcag aaagaaaaca gcaaacgcgtg gaacccggaa	2100
attcagtata ccagcaacta ttataaaagc accagcgtgg atttgcgtt gaacaccgaa	2160

ggcgtgtata gcgaaccgcg cccgattggc acccgctatc tgacccgcaa cctgtaa

2217